

晚期糖尿病大鼠肺脏病理学改变及环孢素 A 保护作用的研究

徐荣慧¹, 刘彦东¹, 韩会民¹, 韩笑², 白忠民¹, 庞金奎¹, 车蔚娟¹, 蒋晓宇¹, 邱明才³, 朱崇贵³

(1. 黑龙江大庆第四医院内分泌科, 黑龙江 大庆 163712; 2. 北京大学人民医院; 3. 天津医科大学总医院)

【摘要】 目的 观察晚期糖尿病(DM)大鼠肺脏病理学改变及环孢素 A(CsA)的保护作用。方法 将 30 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组(CON 组)、DM 组、CsA 治疗组, 每组 10 只。DM 组和 CsA 组一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)55 mg/kg 制备 DM 大鼠模型, 饲养 28 周给予 CsA 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹口服 6 周, DM 组不予治疗。各组大鼠同步饲养 34 周后处死, 立即取肺脏观察组织病理学改变, 并进行免疫球蛋白 IgG、IgA 及核转录因子-κB(NF-κB)、转化生长因子-β1(TGF-β1)的半定量分析。结果 STZ 诱导的晚期 DM 大鼠肺脏存在明显的病理损伤和功能异常; 免疫组化染色证实晚期 DM 大鼠肺脏有较多免疫球蛋白 IgG、IgA 和少量 IgM 沉积, 细胞因子 NF-κB 和 TGF-β1 阳性表达; 应用 CsA 治疗可减少肺脏免疫球蛋白沉积和细胞因子表达。半定量分析显示, DM 组免疫球蛋白 IgA、IgG 及 NF-κB、TGF-β1 的吸光度(A)值显著高于 CON 组, 而 CsA 组显著高于 CON 组, 但明显低于 DM 组(P<0.05 或 P<0.01)。结论 肺脏是 DM 损害的靶器官之一, 应用 CsA 对其有保护作用。

【关键词】 糖尿病大鼠; 肺脏; 环孢素 A; 免疫球蛋白; 核转录因子-κB; 转化生长因子-β1

中图分类号: R587.1; R256.1 文献标识码: A DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.014

A study on advanced lung pathological changes in diabetic rats and the protective effect of cyclosporin A XU Rong-hui*, LIU Yan-dong, HAN Hui-min, HAN Xiao, BAI Zhong-min, PANG Jin-kui, CHE Wei-juan, JIANG Xiao-yu, QIU Ming-cai, ZHU Chong-gui. * Endocrinology Department, Heilongjiang Daqing Fourth Hospital, Daqing 163712, Heilongjiang, China

【Abstract】 **Objective** To study the advanced lung pathological changes in diabetic (DM) rats and the protective effect of cyclosporin A (CsA). **Methods** Thirty Wistar rats were randomly divided into three groups; normal control group (CON group), DM group and CsA treatment group (each n=10). Streptozocin (STZ) 55 mg/kg once was injected into peritoneal cavity to prepare DM rat model in DM and CsA groups. The rats were fed for 28 weeks; in the CsA group, CsA 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹ was administered orally for 6 weeks, and in the DM group, no treatment was given. Synchronously, the rats in the three groups were fed for 34 weeks, then they were sacrificed, and immediately the lungs were taken out and their pathological changes were investigated; in the meantime, the deposition of immunoglobulin IgA, IgG, IgM, and expressions of nuclear factor-κB (NF-κB) and transforming growth factor-β1 (TGF-β1) were semi-quantitatively measured. **Results** At the late stage of STZ induced DM rats, marked pathological changes and functional abnormality were found in their lungs; immunohistochemical staining showed there were a great amount of IgG and IgA and a small amount of IgM deposition, cytokines NF-κB and TGF-β1 positive expressions in the lung tissues. CsA treatment could lower the amount of immunoglobulins deposition and cytokine expressions. The semi-quantitative analyses revealed that the absorbance (A) values of IgG, IgA deposition, NF-κB and TGF-β1 expressions in DM group were significantly higher than those in the CON group; those in the CsA group were obviously higher than those in the CON group, but lower than those in DM group (P<0.05 or P<0.01). **Conclusion** This study demonstrates that the lung is one of the target organs of DM damage, and the administration of CsA has protective effect on it.

【Key words】 diabetic rat; lung; cyclosporin A; immunoglobulin; nuclear factor-κB; transforming growth factor-β1

基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目(D200832); 黑龙江省大庆市科技攻关项目(2009-094)

作者简介: 徐荣慧(1971-), 女(汉族), 黑龙江省人, 副主任医师, Email: yanhan5512309@126.com.

本研究的目的是用链脲佐菌素(STZ)制备晚期糖尿病(DM)大鼠模型, 观察其肺脏病理学变化, 免疫球蛋白 IgG、IgA、IgM 的沉积以及核转录因子-κB

(NF-κB)、转化生长因子-β1(TGF-β1)的表达,并用环孢素 A(CsA)对其进行干预,探讨免疫抑制剂能否缓解 DM 并发症的发生发展,为临床更好地控制 DM 并发症提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 DM 大鼠模型制备:Wistar 雄性大鼠(购自黑龙江中医药大学实验动物科)30 只,体重(180±20)g,按随机数字表法分为 CsA 治疗组、DM 组、正常对照组(CON 组),每组 10 只。DM 组、CsA 组实验前腹腔注射 STZ(美国 Sigma 公司)55 mg/kg。48 h 后取尾静脉血用血糖仪(美国雅培公司)测血糖,2 次血糖值均>16.7 mmol/L 为制模成功。将成模大鼠长期饮用水中加入一定比例 Na⁺、K⁺、Cl⁻、Mg²⁺。每日测血糖水平以指导应用优泌林 70/30(美国礼来公司),2~12 U/d,将血糖控制在 20~25 mmol/L,以防止 DM 大鼠发生急性并发症,使其寿命延长到最大程度。按前期研究的方法,在喂养 24 周时用裂隙灯检查发现大鼠已有明显的白内障,神经和血管已发生相应的病理改变^[1-2]。CsA 组于 28 周给予 CsA 3 mg·kg⁻¹·d⁻¹口服 6 周;DM 组不予其他治疗。各组大鼠同步饲养 34 周处死备检。

1.2 组织病理学检测:股动脉放血处死大鼠,取右肺下叶用中性甲醛水溶液固定,常规脱水、包埋,分别进行苏木素-伊红(HE)染色、Masson 染色及免疫组化染色(半定量分析检测 IgG、IgA、IgM、NF-κB、TGF-β1)。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对输入图像中的阳性反应部位进行吸光度(A)值分析,A 值越高表明其免疫组化信号越强。

1.3 统计学方法:应用 SPSS 16.0 统计软件,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析和直线相关性分析,组间比较用 LSD 法,P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 DM 大鼠制模情况:全部大鼠符合 DM 标准,制模成功。在制模及以后的饲养过程中,DM 组死亡 1 只,CsA 组死亡 2 只。

2.2 肺组织 HE 染色:CON 组肺泡隔、肺泡腔完整,结构清晰,支气管壁完整,肺间质分布均匀;DM 组、CsA 组肺泡隔增宽,部分肺泡腔萎缩、塌陷,肺间质增加,支气管壁增厚,肺泡间隔、细支气管、小血管胶原纤维明显增多,呈红色。

2.3 肺组织 Masson 染色:CON 组肺泡隔、肺泡腔完整,结构清晰,支气管壁完整,肺间质分布均匀,肺泡间隔、细支气管、小血管胶原纤维仅有少量绿色;

DM 组、CsA 组肺泡隔增宽,部分肺泡腔萎缩、塌陷,肺间质增加,以绿色为主,支气管壁增厚,肺泡间隔、细支气管及小血管胶原纤维明显增多,呈绿色。

2.4 肺脏免疫球蛋白免疫组化结果:光镜下可见 CON 组肺脏中细胞间质有少量棕色物质沉积,偶有极少量 IgG、IgA 沉积;DM 组、CsA 组肺脏细胞间质呈棕黄色,有大量 IgG、IgA 沉积,可见明显的阳性棕色沉积物。图像分析测定 IgG、IgA 的 A 值显示(表 1);DM 组的免疫球蛋白沉积显著高于 CON 组(P 均<0.01);CsA 组大鼠免疫球蛋白沉积高于 CON 组(P 均<0.05),但较 DM 组有一定程度的减轻(P 均<0.01)。

表 1 各组大鼠肺脏免疫球蛋白及 NF-κB、TGF-β1 免疫组化结果比较($\bar{x} \pm s$) A 值

组别	动物数	IgA	IgG	NF-κB	TGF-β1
CON 组	10	37 781±12 307	13 109±3 218	55 009±13 713	37 780±16 602
DM 组	9	196 540±60 763 ^b	133 180±19 378 ^b	159 350±28 200 ^b	175 460±26 398 ^b
CsA 组	8	94 022±17 011 ^{cd}	60 771±30 303 ^{cd}	100 900±49 842 ^{bd}	132 330±42 627 ^{bc}

注:与 CON 组比较,^aP<0.05,^bP<0.01;与 DM 组比较,^cP<0.05,^dP<0.01

2.5 肺脏 NF-κB、TGF-β1 免疫组化结果:光镜下可见 CON 组肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞和肺间质无阳性着色或着色很淡;DM 组、CsA 组肺泡上皮细胞、支气管上皮细胞和肺间质均有明显的阳性棕色沉积物。图像分析测定 NF-κB、TGF-β1 的 A 值显示(表 1);DM 组 NF-κB、TGF-β1 沉积均显著高于 CON 组(P 均<0.01);CsA 组大鼠 NF-κB、TGF-β1 沉积显著高于 CON 组(P 均<0.01),但较 DM 组有一定程度的减轻(P<0.01 和 P<0.05)。

2.6 肺脏免疫球蛋白和细胞因子表达的相关性分析:直线相关分析显示,免疫球蛋白 IgG 与 IgA 的沉积无显著正相关(r=0.107,P>0.05)。细胞因子 NF-κB 与 TGF-β1 的表达无显著正相关(r=0.098,P>0.05)。

3 讨 论

长期高血糖状态下肺微血管病变,肺结缔组织蛋白合成增加,而降解率下降使肺胶质和弹性蛋白含量升高,导致 DM 肺脏胶原纤维、网状纤维增多,基底膜增厚,细胞外基质明显增多,且存在明显的微血管病变,最终发展为肺纤维化。本实验发现 CON 组大鼠肺泡隔、肺泡腔完整,结构清晰,支气管壁完整,肺间质分布均匀,肺泡间隔、细支气管以及小血管胶原纤维仅有少量绿色;DM 组大鼠的肺泡隔增

宽,部分肺泡腔萎缩、塌陷,肺间质增加,以绿色为主,支气管壁增厚,肺泡间隔、细支气管以及小血管胶原纤维明显增多,呈绿色,DM 肺脏呈现出纤维化趋势。Weynand 等^[3]在对 DM 患者尸检时证实,DM 患者肺泡上皮和毛细血管内皮基底膜存在明显的损伤改变,肺组织基底膜增厚的程度与肾组织基底膜增厚的程度一致,且与 DM 类型无关。沈轶等^[4]研究表明,DM 肺实质中胶原和弹性蛋白增生、变性,肺泡隔明显增宽,肺泡塌陷和血管狭窄甚至闭索,气体弥散面积减小,基膜增厚使得氧气的弥散距离增加,肺弥散功能下降与全身微血管病变相一致。从而证明肺脏不仅是 DM 损伤的靶器官,更是一种类似于糖尿病肾病、糖尿病视网膜病变的微血管病变^[5]。

本实验中还发现,CON 组大鼠肺脏中细胞间质偶有极少量免疫球蛋白沉积,而 DM 大鼠肺脏细胞间质有多种免疫球蛋白沉积,以 IgG 沉积量最多, IgA 次之, IgM 仅有少量沉积; CON 组大鼠肺泡上皮、支气管上皮细胞和肺间质偶有少量 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达,而 DM 组大鼠肺泡上皮、支气管上皮细胞和肺间质中有大量 NF- κ B 和 TGF- β 1 表达。经过图像分析测定的 A 值显示 DM 组 IgG、IgA 沉积

及 NF- κ B、TGF- β 1 表达量均显著高于 CON 组,表明 DM 肺脏 NF- κ B 和 TGF- β 1 过度表达,前者与肺微血管病变密切相关,后者是导致肺纤维化最重要的因素之一。肺间质中大量免疫球蛋白沉积证明免疫机制参与了 DM 肺损害,而肺脏中炎症因子的过度表达说明 DM 肺损害是一种炎症过程。无论是免疫球蛋白的损伤还是炎症因子的刺激,最终将使 DM 肺损害走向肺纤维化、肺功能异常。

参考文献

- [1] 刘阳,韩会民,徐荣慧,等. 中药解毒生肌膏对大鼠糖尿病足溃疡肌肉中细胞因子影响的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2009,16(1):49-51.
- [2] 吕雅丽,梁龙彦,刘阳,等. 中药解毒生肌膏治疗大鼠糖尿病足的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008,15(4): 233-235.
- [3] Weynand B, Jonckheere A, Frans E, et al. Diabetes mellitus induces a thickening of the pulmonary basal lamin [J]. Respiration, 1999,66(1):14-19.
- [4] 沈轶,尹福在,姚立新,等. 2 型糖尿病患者的肺功能研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2000,8(6):370-379.
- [5] Dalquen P. The lung in diabetes mellitus [J]. Respiration, 1999,66(1):12-13.

(收稿日期:2009-03-20)

(本文编辑:李银平)

• 消息 •

中国科技信息研究所 2008 年版《中国科技期刊引证报告》(核心版)
——中国科技期刊总被引频次总排序表中前 100 位医学类期刊名单

期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	总被引频次	排位	期刊名称	总被引频次	排位
中华护理杂志	5 913	6	中华妇产科杂志	3 490	36	中国矫形外科杂志	2 586	75
中国组织工程研究与临床康复	5 343	8	中华内科杂志	3 238	46	中国误诊学杂志	2 533	77
中华医学杂志	5 028	9	中国实用外科杂志	3 233	47	中华泌尿外科杂志	2 505	78
中华医院感染学杂志	4 691	11	中国药理学通报	3 205	48	中国行为医学科学	2 484	80
中草药	4 660	12	中国中西医结合杂志	3 181	50	中华检验医学杂志	2 419	82
WORLD JOURNAL OF GASTROENTEROLOGY	4 431	14	中华流行病学杂志	3 019	56	中华肿瘤杂志	2 409	84
中国实用护理杂志	4 380	15	中国公共卫生	2 959	58	中华眼科杂志	2 379	85
中华结核和呼吸杂志	4 337	16	实用医学杂志	2 953	59	世界华人消化杂志	2 353	86
中华外科杂志	4 201	18	中国现代医学杂志	2 952	60	第四军医大学学报	2 349	88
中国中药杂志	3 937	23	中国心理卫生杂志	2 858	61	中国危重病急救医学	2 348	89
中华放射学杂志	3 790	24	药学报	2 828	63	中华实验外科杂志	2 345	90
中华心血管病杂志	3 705	26	中华肝病杂志	2 746	65	实用儿科临床杂志	2 321	91
中华骨科杂志	3 673	27	中华神经科杂志	2 714	66	中华医院管理杂志	2 292	94
中华儿科杂志	3 511	34	中国药学杂志	2 699	68	中华消化杂志	2 249	95
护理学杂志	3 504	35	中国实用妇科与产科杂志	2 617	73	中国内镜杂志	2 194	100

——中国科技期刊影响因子总排序表中前 100 位医学类期刊名单

期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位	期刊名称	影响因子	排位
中国药理学通报	1.708	31	中华骨科杂志	1.347	64	中国危重病急救医学	1.208	82
中华结核和呼吸杂志	1.494	48	中华医院管理杂志	1.342	65	中国修复重建外科杂志	1.174	89
中华护理杂志	1.473	49	中华儿科杂志	1.338	66	中华神经外科杂志	1.152	93
中华流行病学杂志	1.436	51	中华显微外科杂志	1.227	80	中华消化杂志	1.123	98
中华医院感染学杂志	1.370	61	中华心血管病杂志	1.217	81	中国感染与化疗杂志	1.121	100